AMEA-nın Xəbərləri (biologiya elmləri), cild 64, №5-6, səh. 102-105 (2009)

Идентификация и Дифференциация Штаммов Листерий, Выделенных из Различных Объектов

Ф.М. Кулибеков[1], Р.М. Потехина[1], Х.Н. Макаев[1], Г.Х. Муртазина[2]
[1]*Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных*
[2]*Казанский государственный медицинский университет*

Изучены культурально-морфологические свойства, патогенность и идентификация специфическими листериозными сыворотками и ПЦР 39 изолятов листерий, выделенных из разных видов животных, абортированных плодов человека и продуктов питания, с целью отбора штаммов данных бактерий для использования при изготовлении диагностикума и средств специфической профилактики листериоза. Подобрана среда для длительного хранения листерий в лабораторных условиях.

Ключевые слова: *листерии, биологические свойства, дифференциация, идентификация*

ВВЕДЕНИЕ

Широкомасштабные эпизоотологические исследования отечественных и зарубежных исследователей свидетельствуют, что листериоз, характеризующийся высокой контагиозностью и летальностью, представляет реальную угрозу здоровью людей и животных. Однако создание средств диагностики и профилактики данной инфекции диктует необходимость выделения и изучения свойств ее возбудителя.

Целью наших исследований являлось изучение биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя листериоза, выделенного от животных и людей из различных объектов и подбор среды для длительного хранения данных бактерий в лабораторных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использованы 39 изолятов листерий, в том числе 5 изолятов, выделенных от крупного рогатого скота, 12 - от овец, 8 - от свиней, 10 - от кроликов и 4 от абортированных плодов человека при проведении клинико-эпизоотологического и эпидемиологического мониторинга листериоза в республиках и областях СНГ и РФ. При изучении свойств взятых в опыт изолятов листерий контролем служили 3 штамма возбудителя рожи свиней, 4 штамма сальмонелл, выделенных от больных поросят и телят, и 5 референтных штаммов листерий, полученных из ВИЭВА и ВГНКИ.

Все отобранные для исследований изоляты листерий выделены из паренхиматозных органов (печень, селезенка, почки), головного мозга и абортированных плодов. После бактериологического и биохимического контроля, изоляты дополнительно дифференцировали от других бактерий моно- и полиспецифическими диагностическими листериозными сыворотками. Для этих целей использовали листериозную сыворотку OI, II (О-факторы I и II) для отделения типов 1, 2, 3 от 4-го и листериозную сыворотку ОУ (О-факторы У) для отделения типа 4 от 1, 2, 3. Контролем на аутоагглютинацию служила суспензия листерий в физиологическом растворе. Для контроля типоспецифичности листериозных сывороток использовали референтные штаммы возбудителя рожи свиней – «106», сальмонелл – «2505» и листерий – «799» 1 серотипа, «9-128» 2серотипа, «9-129» 3 серотипа, «9-130», «9-72» 4 серотипа.

Для выращивания культур были взяты питательные среды: простой МПА и бульон, МППА и бульон, МПА и бульон с 0,5% глюкозы и 1% глицерина, МПА с добавлением метиленовой сини 1:40000, генциан-виолета 1:80000 и 0,002% теллурита калия, 0,3% полужидкий МПА под вазелиновым маслом. Гемолитическую активность изучали на средах с добавлением эритроцитов барана, а каталазную активность – при добавлении в односуточную бульонную культуру листерий 3%-ного раствора перекиси водорода. Все среды брали с одинаковым pH – 7,2-7,4.

Морфологические свойства листерий изучали в мазках, окрашенных по Граму, подвижность – методом раздавленной капли, индолообразование – по способу Сальковского, ферментативную активность определяли на жидких питательных средах с добавлением углеводов и высокоатомных спиртов.

Идентификацию взятых в опыт изолятов осуществляли индикацией генома возбудителя

полимеразной цепной реакцией (ПЦР). ДНК из биомассы бактерий выделяли по методу Мармура. Пробы для ПЦР анализа готовили экспресс лизированием. ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» в автоматическом режиме, поддерживающем заданные температурные и временные параметры реакции.

Патогенность и вирулентность отобранных изолятов и референтных штаммов листерий проверяли на 780 белых мышах весом 14,0-16,0 при подкожном и внутрибрюшинном заражении, на 140 морских свинках весом 250,0-300,0 при внутрибрюшинном введении и конъюнктивальной аппликации культуры листерий. Наиболее вирулентных 8 изолятов дополнительно испытали на 48 кроликах при внутримышечном и внутрибрюшинном заражении. Концентрацию микробных тел в суспензии культур определяли по оптическому стандарту мутности ГНКИ им. Тарасевича, а также посевом последовательных разведений на пластинки агара. Наблюдение за опытными животными продолжали 30-45 дней.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические, культуральные, биохимические свойства 35 изученных изолятов листерий в основном были сходны с описанными в литературе, за исключением лишь некоторых индивидуальных различий. Они представляли собой Грам-положительные палочки с закругленными концами, не образующие спор и капсул, обладали сахаролитическими, гемолитическими свойствами, каталазной активностью и способностью редуцировать краски (метиленблау, конгорот, нейтральрот), не свертывали молоко, не разжижали желатину. В то же время 2 изолята, выделенные от кроликов и 2 – от плодов человека, имели кокковидную форму, сворачивали молоко и обладали слабой каталазной активностью. На питательных средах все взятые в опыт изоляты давали характерный для листерий рост: в МПБ – в виде равномерного помутнения, на МПА – в виде прозрачных, с голубоватым оттенком в проходящем свете, слегка выпуклых колоний; в 0,3%-ном полужидком МПА при посеве уколом росли сплошным столбиком. Более пышный рост листерий наблюдали на МПА с добавлением 0,5% глюкозы и 1% глицерина. На МПА с добавлением метиленовой сини (1:40000) образовывали круглые с ровными краями колонии в диаметре 1-3 мм, центральная зона которых была ярко голубовато-зеленого цвета, интенсивность которого к краю колонии снижалась, на среде с теллуритом калия восстанавливали металлический теллурит, и колонии приобретали черный цвет, чего не наблюдали при посеве рожистых бактерий и сальмонелл.

На подвижность листерий влияли сроки инкубации и температурный режим. Наиболее активное движение наблюдали через 24 часа инкубации при комнатной температуре у 20 изолятов, менее активное – у 7, и 3 изолята были неподвижны, а при инкубации в термостате (37^0) в течение этого же времени активное движение наблюдали у 5 изолятов, слабо выраженное – у 12 и 13 (в том числе 4 изолята кокковидной формы) - были неподвижны. Данное обстоятельство следует учитывать при идентификации и дифференциации листериозных культур от других грампозитивных микробов.

При пересевах гемолитическая активность некоторых изолятов усиливалась, а при неоднократном пассажировании через лабораторных животных изменений гемолитической активности не наблюдали. Не установлена корреляция между гемолитической активностью и вирулентностью данных изолятов.

По результатам исследования взятых в опыт изолятов с типоспецифической сывороткой OI, II и OУ – отобранные 26 изолятов листерий отнесены к первому серотипу, так как все они агглютинировались листериозной сывороткой OI и II; 9 – ко второму и 4 (из которых один выделен из плода человека) – к четвертому серотипу.

Для хранения листерий в лабораторных условиях использовали МПБ, МПА, МППА и 0,3%-ный полужидкий МПА под вазелиновым маслом. В результате многочисленных высевов, пересевов и заражения белых мышей в разные сроки хранения установлено, что для длительного хранения (без изменения первоначальных биологических свойств) наиболее пригодной средой является 0,3%-ный полужидкий МПА под вазелиновым маслом. Жизнеспособность и вирулентность листерий при хранении в данной среде сохранялось в течение 2-х лет (срок наблюдения), что подтверждено в опытах на белых мышах, тогда как посевы культур хранившихся в МПБ, были стерильными через 1,5 месяца, а на агаровых пластинках – спустя 1 месяц.

При изучении патогенности и вирулентности взятых в опыт изолятов установлено, что наиболее патогенными для белых мышей оказались 10 изолятов, вирулентность которых составляла 250, 500 тыс.м.к., 12 – в дозах от 1 до 100 млн.м.к., в то время как 6 – оказались слабовирулентными (более 1 млрд.м.к.), а 3 изолята – апатогенными.

Испытания на морских свинках показали, что наиболее патогенны 20 изолятов, вирулент-

ность которых составляла 500 тыс.м.к., 11 – в дозах 100 млн.м.к., 5 – слабовирулентны (более 1 млрд.м.к.), а 3 изолята – не патогенны.

Вирулентными для кроликов были изоляты листерий «Т-86», «А», «Б», «Ч», «М-1», «1867» и «Казахстан», которые вызывали гибель кроликов при внутрибрюшинном введении возбудителя в дозе 500 тыс.м.к., а при введении внутримышечно – от 1млрд.м.к.

При аппликации на конъюнктиву морских свинок бульонной культуры 31 изолята (в том числе и кокковидных) развивался выраженный конъюнктивит на 2-5-й день, 6 изолятов – на 6-9 сутки. Если при аппликации 37 изолятов регистрировали положительную реакцию (хотя и в не одинаковой степени), то нанесение двух изолятов на конъюнктиву даже в дозе 2 млрд.м.к. в объеме 0,1 мл не привело к развитию конъюнктивита, не смотря на то, что эти изоляты по всем свойствам отнесены к листериям.

Наиболее перспективным методом для выявления возбудителей инфекционных болезней и их идентификации по генетическим маркерам является ПЦР. К настоящему времени описано несколько систем для амплификации различных участков генома *L.monocytogenes* (Александрова и др., 2005; Бакулов и др., 2004; Жаргалова и др., 2000). Учитывая это, провели идентификацию взятых в опыт изолятов листерий с помощью ПЦР. Были использованы праймеры, комплементарные к участкам гена А, отвечающего за продуцирование листериолизина, так как данные пары праймеров инициируют синтез специфичных фрагментов только на матрице ДНК листерий. В результате анализа нуклеотидных последовательностей на основе имеющихся в базе Gen Banka данных установлено, что использованные в эксперименте изоляты отнесены к *L.monocytogenes*, не зависимо от патогенности, формы бактериальной клетки, объекта и географии выделения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение культурально-морфологических, серологических, биохимических, молекулярно-генетических и вирулентных свойств листерий, выделенных от разных видов сельскохозяйственных животных и абортированных плодов человека, подтвердило их типичность. Различий в зависимости от места, объекта и географии выделения не установлено.

При изучении вирулентных свойств листерий на лабораторных животных установлено, что 18 изолятов обладают высокой и стабильной вирулентностью, 6 – слабовирулентны, а 2 – в испытанных дозах не патогены.

0,3%-ный полужидкий МПА под вазелиновым маслом (0,5 см) является наиболее благоприятной средой для длительного хранения листерий в лабораторных условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Александрова Н.М. Алимов М.А., Алимов А.М. (2005) Контаминированность объектов ветеринарного надзора возбудителем листериоза. Матер. междунар.симп. Казань, **II:** 9-13.

Бакулов И.А., Котляров В.М., Фирсова Т.Е., Чевелева С.С., Кольпикова Т.Н. (2004) Листериоз как пищевая инфекция и современные методы лабораторной диагностики. Всерос. науч.-исслед. ин-т ветеринар. вирусологии и микробиологии. Покров: 102-106.

Жаргалова Т.Т. Котляров В.М., Цыбанов С.Ж. (2000) Современные методы типирования патогенных листерий. Междунар. науч.-практ.конф. «Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзот. и зооантропоноз. болезнями животных» Сб.ст. Покров, 252-255.

F.M. Gulubayov, R.M. Potechina, Kh.N. Makayev, G.Kh. Murtazina

Biological Features of *Listeria* Strains Isolated in CIS Countries and Russia

The aim of the study was to identify listeria bacteria strains that can be used for listeriosis diagnostics and prevention. Listeria strains isolated in the CIS countries and Russia were investigated for their cultural and morphological features, pathogenicity, and specificity. Medium for listeria long-term storage in laboratory conditions was selected.

F.M. Qulubəyov, R.M. Potexina, X.N. Makayev, G.X. Murtazina

Müxtəlif Obyektlərdən Ayrılmış Listeriya Ştammlarının Identifikasiyası və Differensiasiyası

Müxtəlif növ kənd təsərrüfatı heyvanlarından və abort olunmuş insan embrionundan ayrılmış listeriyaların kultural-morfoloji, seroloji, biokimyəvi, molekulyar-genetik və virulent xüsusiyyətləri öyrənilmiş və təsdiq olunmuşdur. Laborator heyvanları üzərində listeriyanın virulent xüsusiyyətinin öyrənilməsi göstərir ki, 18 izolyat yüksək və stabil virulentli, 6-sı zəif virulentli və 2-si tətbiq olunmuş dozada patogen olmamışdır. Listeriyanın laboratoriya şəraitində uzun müddət saxlanması üçün 0,3 sm qalınlığında vazilen yağı altında 0,5%-li yarımmaye ƏPA mühiti daha münasibdir.